

機序を有していた。

② 臨床評価方法の検討

筋ジストロフィーを対象とした臨床試験は18試験が確認され、主目的別には、8試験が有効性評価（NCT00758225、NCT01027884、NCT01037309、NCT01153932、NCT01254019、NCT01480245、NCT01462292、NCT01396239）、9試験が安全性評価（NCT00104078、NCT00758225、NCT00592553、NCT00759876、NCT00847379、NCT01009294、NCT01247207、NCT01099761、NCT01239758）、そして1試験が薬物動態評価（NCT01128855）であった。有効性評価が主目的であった8試験のうち、6試験が無作為化プラセボ対照二重盲検比較試験（以下、プラセボ対照試験）であった。

有効性評価を主目的としたプラセボ対照7試験の主要評価項目は、2試験（NCT01254019及びNCT01462292）が運動機能（6分間歩行検査）、4試験（NCT00654784、NCT01027884、NCT01037309、NCT01396239）が代替指標（左室機能、%最大呼気量、ジストロフィン発現）による評価が行われ、残り1試験（NCT01153932）の評価方法は不明であった。また、運動機能（6分間歩行検査）による有効性評価が行われたプラセボ対照試験は2試験（NCT01254019及びNCT01462292）とも国際共同治験として実施されていた。

D. 考察

医薬品開発が活発な疾患領域は、臨床試験の実施数から、国内外とも、がん、中枢神経系、そして循環器領域であることが指摘^{1) 2)}されている。中枢神経系疾患では、

2005年から2011年に開始された臨床試験数（第II相及び第III相）は、大うつ病性障害202試験と最多で、次に統合失調症173試験であったと報告³⁾されている。筋ジストロフィーを対象とした企業主導の臨床試験は2005年以降に開始されるようになり、大うつ病性障害及び統合失調症と比較すると、臨床試験の実績から考えて、臨床評価方法は絶えず検討が必要な疾患領域と言える。

筋ジストロフィーを対象とした臨床試験には、以下の特徴が挙げられる。

- ・ 2005年から2010年までは、安全性評価を主目的とした臨床試験が多かった
- ・ 欧米では試験が開始された2005年から既にプラセボ対照試験が実施されていた
- ・ 2010年までは代替指標により有効性評価が行われていたが、2011年になり運動機能（6分間歩行）による有効性評価が行われるようになった

筋ジストロフィーを対象とした臨床試験の臨床評価方法としては、筋ジストロフィーは希少疾患であるため、臨床試験の実施が困難である疾患であるが、代替指標による評価から真のアウトカムに近い運動機能を評価を主要評価項目とする試験に移行する傾向があることは、急速な発展がみられていると言える。近年は、運動機能及び心肺機能を組み合わせた複合評価指標の開発⁴⁾も行われており、臨床的意義の観点から薬効評価としてより適切な有効性評価指標を検討していく必要があると考える。また、今後の臨床試験の計画にあたっては、開発相に応じた試験の目的から、いずれの有効性評価指標を選択していくかは規制当局と

の協議により決定していく必要があると考える。

E. 結論

承認申請を目的とした Duchenne 型筋ジストロフィーに対する臨床試験については、希少疾患であるために臨床試験の実施が困難である領域であるにも関わらず、臨床的意義を評価可能であると思われる運動機能が主要評価項目に設定される等、急速な発展を遂げている。今後の臨床試験の計画においては、各開発相の目的に応じてより適切な主要評価項目を検討していくことが急用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 中林哲夫: プラセボ効果. 内海健, 神庭重信, 藤山直樹編. 精神医学キーワード事典. 中山書店. 東京. 650-652, 2011
2. 中林哲夫: 「抗うつ薬の臨床評価方法に関するガイドライン」の作成背景. 日本神経精神薬理学雑誌. 31 (4): 169-176, 2011
3. 中林哲夫: Escitalopram と他のうつ薬との有効性の比較. 臨床精神薬理. 14 (8): 1303-1312, 2011

4. 中林哲夫: Escitalopram と他の抗うつ薬との安全性の比較. 臨床精神薬理. 14 (8): 1313-1322, 2011
5. 中林哲夫, 玉浦明美, 近野健一: 日本における医薬品開発の現状と展望 精神神経疾患領域の臨床開発を中心に. ファルマシア. 47 (9): 793-798, 2011
6. 中林哲夫: 抗うつ薬の課題と未来. 医学のあゆみ. 236(10): 916-922, 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

【引用文献】

- 1) Karlberg JP. Trends in disease focus of drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 639-640, 2008
- 2) 中林哲夫, 玉浦明美, 近野健一: 日本における医薬品開発の現状と展望 精神神経疾患領域の臨床開発を中心に. ファルマシア. 47 (9): 793-798, 2011
- 3) 中林哲夫, in print
- 4) The Cooperative International Neuromuscular Research Group homepage: online available at <http://www.cinrgresearch.org/>

表1 企業主導で実施された筋ジストロフィー対象の臨床試験

化合物	ClinicalTrials.gov No.	開始年	開発相	試験デザイン	目標症例数	投与期間(週)	対象年齢層			主要評価	実施国
							小児	非高齢者	高齢者		
MYO-029	NCT00104078	2005	I/II	無作為化非対照二重盲検クロスオーバー	108	-	-	●	●	安全性評価	US
idebenone	NCT00654784	2005	II	無作為化プラセボ対照二重盲検比較	21	52	●	-	-	左室機能	BE
	NCT00758225	2008	II	非盲検非対照	21	96	●	●	●	安全性評価	BE
	NCT01027884	2009	III	無作為化プラセボ対照二重盲検比較	240	52	●	●		% 最大呼気量	US, AUR, BE, F, G, NE, SWE, SWI
ataluren (PTC124)	NCT00592553	2008	II/III	無作為化二重盲検比較	165	48	●	●	●	安全性評価	US, AUL, BE, CA, F, G, IS, IT, SP, SWE, UK
	NCT00759876	2008	II	非盲検非対照 (継続長期投与試験)	38	96	●	●	●	安全性評価	US
	NCT00847379	2009	II/III	非盲検非対照 (継続長期投与試験)	174	96	●	●	●	安全性評価	US, AUL, AUR, BE, CA, F, G, IS, IT, SP, SWE, UK
	NCT01009294	2009	II	非盲検非対照	30	48	●	●	●	安全性評価	US
	NCT01247207	2010	III	非盲検非対照	110	-	●	●	●	安全性評価	US
PRO044	NCT01037309	2009	I/II	非盲検非対照	18	5	●	-	-	ジストロフィン発現	BE, IT, NE, SWE
ACE-031	NCT01099761	2010	II	無作為化プラセボ対照二重盲検比較	24	24	●	●	●	安全性評価	CA
	NCT01239758	2010	II	非盲検非対照 (継続長期投与試験)	11	28	●	●	●	安全性評価	CA
GSK2402968	NCT01128855	2010	I	無作為化プラセボ対照二重盲検比較	20	5	●	●	●	薬物動態	US, F
	NCT01153932	2010	II	無作為化プラセボ対照二重盲検比較	54	48	●	●	●	有効性評価 (詳細不明)	AUL, BE, F, G, IS, NE, SP, TU, UK
	NCT01254019	2010	III	無作為化プラセボ対照二重盲検比較	180	48	●	●	●	6分間歩行	J, AR, BE, CA, CH, CZ, D, F, G, IT, K, NE, NR, P, R, SP, TW
	NCT01480245	2011	III	非盲検非対照 (継続長期投与試験)	220	104	●	●	●	6分間歩行	J, BE, CA, F, G, NE, SP, UK
	NCT01462292	2011	II	無作為化プラセボ対照二重盲検比較	54	24	●	●	●	6分間歩行	US
AVI-4658 (eteplirsen)	NCT01396239	2011	II	無作為化プラセボ対照二重盲検比較	12	24	●	-	-	ジストロフィン発現	US

情報源：NIH 臨床試験登録データベース (<http://www.clinicaltrials.gov>)

J: 日本, US: 米国, AR: アルゼンチン, AUL: オーストラリア, AUR: オーストリア, BE: ベルギー, CA: カナダ, CH: チリ, CZ: チェコ, D: デンマーク, F: フランス, G: ドイツ, IS: イスラエル, IT: イタリア, K: 韓国, NE: オランダ, NR: ノルウェー, P: ポーランド, R: ロシア, SP: スペイン, SWE: スウェーデン, SWI: スイス, TW: 台湾, TU: トルコ, UK: イギリス

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業 (臨床研究推進研究事業))
分担研究報告書

臨床治験の準備に関する研究

研究分担者 村田 美穂
国立精神・神経医療研究センター病院
神経内科診療部 部長
研究協力者 森 まどか
国立精神・神経医療研究センター病院
神経内科

研究要旨

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する、モルフォリノを用いたエクソンスキップ治療を臨床応用するための基盤整備として、対象患者の把握、情報発信、国際共同治験の準備及び患者組み入れ、国際共同臨床研究への参加を行った。新規治療法の臨床応用を見据え、今後は患者、家族、医療関係者、国民全体に対し、より一層正確な情報発信が重要である。

A. 研究目的

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する、モルフォリノを用いたエクソン 51 スキップ治療を臨床応用するための臨牀的な基盤を整備する。

B. 研究方法

1) 対象患者のリクルートと患者数の把握
我々はDuchenne型筋ジストロフィーの遺伝子治療を進めるために、昨年度に引き続き全国規模のジストロフィノパチーデータベースである Registry of Muscular Dystrophy (REMUDY, <http://www.remudy.jp>) の運営に関与し、広く国内全体の患者において今回のエクソン51スキッピングの対象患者の検索を行った。また、病院内のデータベースの整備を行った。

2) 情報発信
患者、家族、医療者に本疾患及びその治療法等について正確な情報を発信するため、HPから発信の他に筋ジストロフィー公開講座を開催した。

3) 国際共同治験への参加

モルフォリノの臨床治験のための基盤整備を進めていたが、GlaxoSmithkrine社によって、エクソン51スキッピングを誘発させるアンチセンスオリゴヌクレオチドであるGSK9681による国際共同治験が開始された。我々は我が国の本治験の中核施設としてこの治験に参加している。

4) Newcastle 大学およびTREAT-NMD によって行われるdysferlinopathyに対する自然歴国際共同研究に参加し、3年間にわたりコホート内の評価パラメーターの変化を特定し、筋ジストロフィーの評価法を明確にする。

(倫理面への配慮)

患者データベースについてはすでに倫理委員会の承認を得ている。治験参加についてはIRBの承認を得て進めた。Dysferlinopathy自然歴研究ではNewcastle大学の倫理委員会の承認を得たものを元に倫理申請準備中である。

C. 研究成果

1) 対象患者のリクルートと患者数の把握
REMUDY への参加患者数は順調に増加しており、2012年2月現在で876人となっている。遺伝子異常について情報が不十分な場合は順次検索し、エクソン51スキップ対象患者(エクソン50ないし52の単独欠失13人、エクソン48-50 9人、エクソン49-50 20人、エクソン45-50 欠失17人、うち15歳未満38人)をリストアップした。

2) 情報発信

モルフォリノをはじめとする今後開発が期待されている新規治療法を然るべき患者に適切に届けるためには、患者、家族、医療者、さらには国民全体に本疾患および、その治療法等について正確な情報を知っておいてもらうことが非常に重要である。

既にNCNPおよびREMUDYのHPを用いて情報発信を行っているが、双方向での情報確認とするために公開講座を開催している。本年度は2011年7月2日に第8回筋ジストロフィー公開講座を行った。今回は「筋ジストロフィー治療研究の進歩」(NCNP神経研究所遺伝子疾患治療研究部 永田哲也室長)、「筋ジストロフィーといわれたら - 筋ジストロフィーの基礎知識と病院の利用の仕方」(NCNP病院神経内科 森まどか医師)、「筋ジストロフィーの呼吸リハビリテーション・停電への備え - 人工呼吸器・吸引器をお使いの方へ」(NCNP病院リハビリテーション科 小林庸子医長)の3講演を行い、特に災害対策については東日本大震災に際してNCNPが培ったノウハウを領付した。2010年度に好評であった「先生に質問！」コーナーも継続し、例年通り定員100名に対して120名の参加者があった。

3) 国際共同治験への参加

国際共同治験であるGSK2402968へ参加し、共同研究者の小牧医師らが詳細な検討を行い、我が国での本治験の中核施設として、既に7人で治験を開始している。

また同様に、国際共同治験である米国の筋

ジストロフィー臨床研究基盤整備グループCINRGと協調したdystrophinopathy/肢帯型筋ジストロフィーに対するリシノプリル+CoQ10の国際共同治験の開始が予定されており、本邦では当センターのみ参加する。共同研究者の小牧医師を中心として患者の組み入れを行っている。

4) 国際共同臨床研究への参加

国際共同臨床研究であるdysferlinopathy natural history studyへの参加が決定した。当センター及び13の共同研究施設の患者150人の多施設評価から、dysferlinopathy 治験の評価指標について、3年にわたって6ヶ月毎に定量的シークエンスを含むMRI、医師及び理学療法士による定量的運動機能及び筋力評価、臨床検査を行う。アジアからはNCNPのみが参加しており、参加を通じて筋ジストロフィー治療に役立つ臨床評価項目の確立を行う。既にMRIおよび理学評価の品質管理として、英国およびフランスでの講習受講を終了した。遺伝子診断が参加要項であるためdysferlin 遺伝子診断のセットアップが終了し、25名程度の患者の遺伝子解析を開始した。

D. 考察

1) 対象患者のリクルートと患者数の把握
REMUDYの協力を得て、比較的順調に進行している。情報提供のため、本年度より情報誌「Remudy通信」の発行頻度を年4回に増やし、情報発信を行った。

2) 市民講座による情報発信は、前年度に引き続き双方向性に留意し、質問コーナーを継続して好評であった。講演の感想も概ね好評であり、市民公開講座の参加後に医療の必要性に気づいて当院外来を受診する患者が毎年数名程度おり、本年も筋疾患外来に3名ほど、講座参加者の受診があった。より詳細な、あるいは希少な筋ジストロフィーへ対応するため、来年度はグループ討議も導入予定である。毎回公開講座は反響が大きく、今後も継

続するとともに記録集を出版していく必要もあると考えている。また毎回、抄録をNCNPホームページに掲載して役立ててもらっている。

3) 国際共同治験への参加

今回の治験への参加を進めつつ、今後はこれまで行ってきた基盤整備の検証を進める必要がある。

4) 国際共同臨床研究への参加

dysferlinopathy natural history は筋疾患に対する定量 MRI および定量的筋力・機能評価指標を筋ジストロフィーの自然歴に即して有効性を判定する画期的な試みである。標準化を行うことで日常臨床の見直しも必要と考えている。

E. 結論

臨床治験開始に向けての基盤整備を行ってきた。今後今回の国際共同治験の進行を見ながら、これまでの基盤整備の検証を行う必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他、特記事項

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
青木吉嗣, 武田伸一	デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法	小林祥泰 水澤英洋	神経疾患 最新の治療 2012-2014	南江堂	東京	2012	48-53
Yokota T, Takeda S	Antisense oligo-mediated multiple skipping in a dog model of duchenne muscular dystrophy	Duan D	Muscle gene therapy, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology	Springer Science+ Business Media	USA	2011	299-312
Nagata T, Takeda S	The frontier of antisense oligonucleotide induced therapy	Takeda S	Fifty years of neuromuscular disorder research after discovery of creatine kinase as a diagnostic marker of muscular dystrophy	IGAKU-SHOIN Ltd	Japan	2011	56-67
木村重美	筋ジストロフィー、筋強直ジストロフィー	遠藤文夫	小児科診療ガイド	中山書店	In press		
中林哲夫	プラセボ効果	内海健, 神庭重信 藤山直樹	精神医学キーワード事典	中山書店	東京	2011	650-652

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu CC, Mori K, Oda T, Kuga A, Kurahashi H, Akman HO, DiMauro S, Kaji R, Yokota T, Takeda S, Toda T	Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy.	<i>Nature</i>	478	127-131	2011
Takano H, Fujii Y, Yugeta N, Takeda S, Wakao Y	Assessment of Left Ventricular Regional Function in Affected and Carrier Dogs with Duchenne Muscular Dystrophy Using Speckle Tracking Echocardiography.	<i>BMC Cardiovasc Disord</i>	11	1-8	2011
Yamada T, Okaniwa N, Saneyoshi H, Ohkubo A, Seio K, Nagata T, Aoki Y, Takeda S, Sekine M	Synthesis of 2'-O-[2-(N-Methylcarbamoyl)ethyl] ribonucleosides Using Oxa-Michael reaction and chemical and biological properties of oligonucleotide derivatives incorporating these modified ribonucleosides.	<i>J Org Chem.</i>	76	3042-3053	2011
Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, Sekiguchi M, Takeda S, Hashido K	Identification of Muscle-Specific MicroRNAs in Serum of Muscular Dystrophy Animal Models: Promising Novel Blood-Based Markers for Muscular Dystrophy.	<i>PLoS One.</i>	30	e18388	2011

Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S	Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers.	<i>Hum Mol Genet.</i>	20	1787-1799	2011
Nakao S, Kimura S	Checking exon-skipping events in candidates for clinical trials of morpholino.	<i>Pediatr Inter</i>	53	524-529	2011
Yukihara M, Kimura S	Effective Drug Delivery System for Duchenne Muscular Dystrophy Using Hybrid Liposomes Including Gentamicin along with Reduced Toxicity.	<i>Biol Pharm Bull</i>	34	712-716	2011
中林哲夫	「抗うつ薬の臨床評価方法に関するガイドライン」の作成背景	日本神経精神薬理学雑誌	31 (4)	169-176	2011
中林哲夫	Escitalopramと他のうつ薬との有効性の比較	臨床精神薬理	14 (8)	1303-1312	2011
中林哲夫	Escitalopramと他のうつ薬との安全性の比較	臨床精神薬理	14 (8)	1313-1322	2011
中林哲夫, 玉浦明美, 近野健一	日本における医薬品開発の現状と展望 精神神経疾患領域の臨床開発を中心に	ファルマシア	47 (9)	793-798	2011
中林哲夫	抗うつ薬の課題と未来	医学のあゆみ	236(10)	916-922	2011

デュシェンヌ型筋ジストロフィー に対するエクソン・スキップ療法

青木吉嗣, 武田伸一

筋ジストロフィーのうち、最も患者数が多く重症のデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対する新しい治療法として、アンチセンス人工核酸を用いたエクソン・スキップ療法が近年有望視されている。われわれは、DMDモデルマウスを対象にした前臨床的研究を行い、エクソン51スキップにより短縮型ジストロフィンを正常の約20%誘導することで、筋機能が改善することを実証した¹⁾。一方、DMD患者を対象とした、アンチセンス人工核酸の経皮下全身投与によるエクソン51スキップの用量漸増試験(第I/IIa相)の結果が、2011年の『New England Journal of Medicine』に報告された²⁾。これらの成果を受けて、エクソン51スキップの国際共同治験(第III相)が日本、フランス、ドイツなどで進行中である。

本項では、DMDの新規治療法の中で、最も臨床応用に近いと期待されている、アンチセンス人工核酸を用いたエクソン・スキップ療法について、どのように研究が進められ、臨床への展開が期待されているのかを中心に述べたい。

A | デュシェンヌ型筋ジストロフィー とベッカー型筋ジストロフィー

筋ジストロフィーは、骨格筋の変性、壊死、再生を主病変とし、臨床的には進行性の筋力低下をみる遺伝性の疾患である。筋ジストロフィーのうち、最も患者数が多く重症なデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン遺伝子 (Xp21.2) の変異により、骨格筋形質膜の安定に重要なジストロフィンが欠損することで発症する³⁾。DMDは、X染色体連鎖性の遺伝形式をとり、新生男児3,500人に1人の割合で発症する。2～5歳時に歩行の異常で気づかれることが多く、徐々に筋力低下が進行して11～13歳頃に独り歩きができなくなり、30歳前後で心不全や呼吸不全で死に至る⁴⁾。

一方で、ジストロフィンの欠損が不完全な場合には軽症のベッカー型筋ジストロフィー (BMD)

の表現型をとる⁵⁾。BMDの表現型は、高クレアチンキナーゼ血症のみを呈する軽症から、DMD同様に高度な筋萎縮と筋力低下を呈する重症なものまで多岐にわたるが、一般にDMDに比べ骨格筋症状は軽いことが多い⁴⁾。

B | ジストロフィン遺伝子変異の表現 型とフレームシフト説

ジストロフィン遺伝子変異の内訳は、欠失65%、重複9%、点変異26%である⁶⁾。特に、エクソン3-8領域および45-55領域の2ヵ所に欠失や挿入変異が集中するホットスポットが存在する⁶⁾。Monacoらは、ジストロフィン遺伝子の欠失を有する患者において変異によるアミノ酸の読み枠のズレに注目し、欠失するエクソンの塩基の総計が3の倍数の場合(インフレーム)にはBMD、3の倍数でない場合(アウトオブフレーム)にはDMDの表現型をとることを発見し、「フレームシフト説」を提唱した⁵⁾。「フレームシフト説」の適合性は90%を超え、特にジストロフィンのロッドドメインに生じた変異のほとんどを説明可能である⁷⁾。

C | デュシェンヌ型筋ジストロフィー に対する新規治療法開発の動向

現在、DMDに対して有効と認められている治療は、糖質コルチコイド治療、脊椎変形に対する対症的な手術治療と呼吸補助および心不全に対する対策だけであり、いまだ筋変性・壊死を阻止する決定的な治療法はない⁴⁾。DMDに対する新しい治療戦略は、アンチセンス人工核酸、5型ホスホジエステラーゼ阻害薬、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬、マイオスタチン阻害薬などを用いた薬物治療、アデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子治療、筋衛星細胞を用いた細胞治療の3つに大きく分類できる (<http://www.cureduchenne.org/site/PageServer?pagename=research_index>)。その中で、最も臨床応用に近

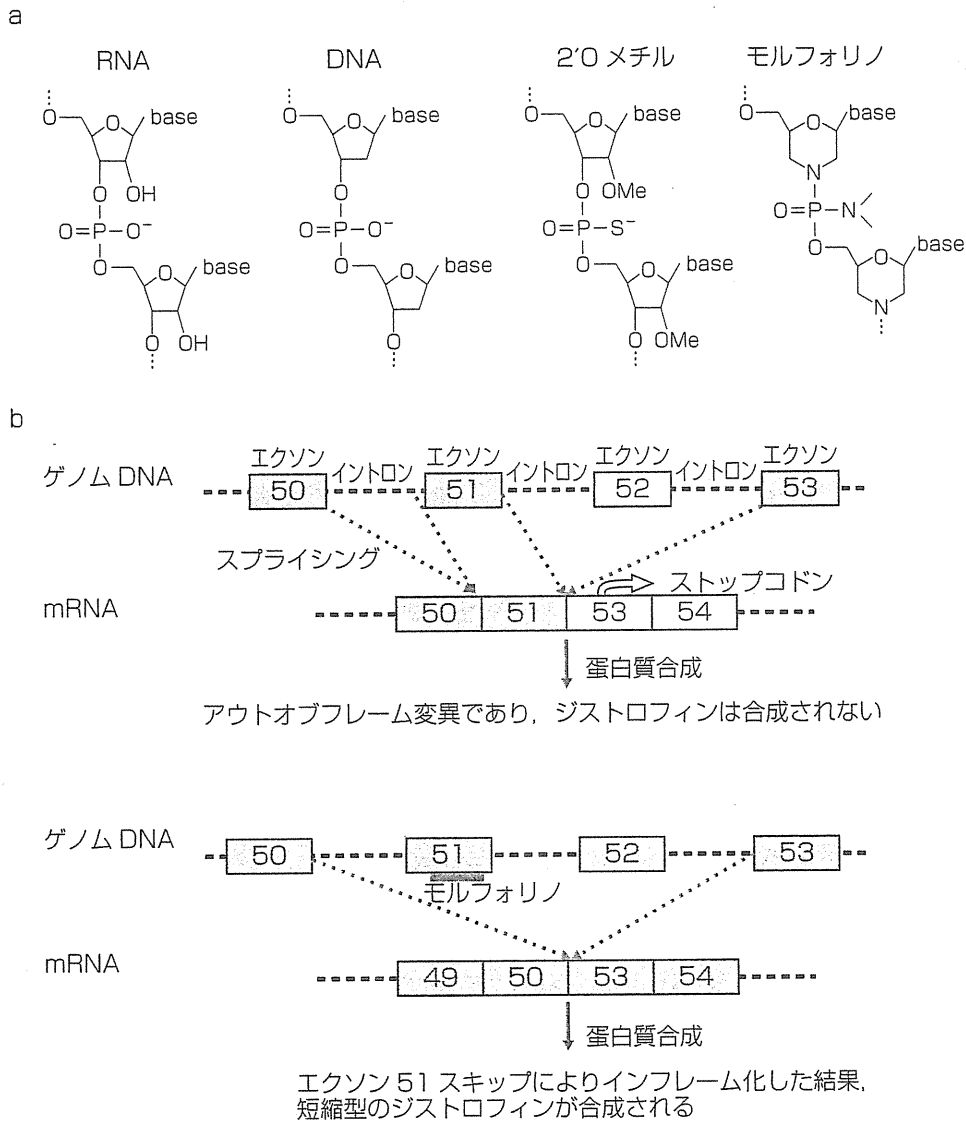


図 1 ◆ アンチセンス人工核酸を用いたエクソン・スキップ療法

a: エクソン・スキップに用いるアンチセンス人工核酸の化学式。

b: *mdx52* マウスに対するエクソン 51 スキップの原理。 *mdx52* マウスにおけるスプライシング (上段)、モルフォリノによるエクソン 51 スキップの誘導 (下段)。

いと期待されている治療法は、アンチセンス人工核酸を用いたエクソン・スキップ療法である。

エクソン・スキップでは、アンチセンス人工核酸を用いて、mRNA 前駆体から mRNA へのスプライシングの過程で、RNA-蛋白質複合体であるスプライソソームと mRNA 前駆体の特異的配列との結合を阻害することにより、遺伝子変異をもつ、あるいはその近傍のエクソンを人為的にスキップさせて、アウトオブフレーム変異をインフレーム化することを企図している (図 1)。エクソン・スキップにより発現回復するジストロフィン

は、正常なジストロフィンの蛋白質構造を一部欠くことになるが、アクチン結合ドメインやシステインリッチドメインなどの重要な領域は保存される。その結果、重症の DMD の表現型が軽症に変換されることが期待できる⁴⁾。現在、筋ジストロフィーのモデル動物を用いた *in vivo* での研究や治療に使用されている代表的なアンチセンス人工核酸には、2'O-メチルとモルフォリノがある (図 1a)。そのうち、モルフォリノは、モルフォリン環構造をもつため水溶性が高く、標的 mRNA 前駆体に対し非常に強い配列特異的な結合が可能であり、Toll-like receptor を介した免疫応答の誘導がない、ヌクレアーゼなど生体内酵素による分

解を受けにくいなどの長所がある。一方、電荷をもたないため細胞膜の通過性が低い点が課題として指摘されている⁴⁾。

D | DMDのモデル動物を対象にしたエクソンスキップの研究成果

当センターでは、アンチセンス人工核酸の薬剤承認をめざして、DMDのモデル動物を対象にしたエクソン・スキップの前臨床的研究を精力的に実施してきた。最初の成果は、筋ジストロフィー犬を対象にしたエクソン6/8スキップである。筋ジストロフィー犬は、ジストロフィン遺伝子のイントロン6のスプライス部位に点変異をもち、そのmRNAはエクソン7を欠失するためアウトオブフレームとなる。そこで、エクソン6および8を標的とした合計3種類のモルフォリノをカクテルにして経静脈反復投与を行い、明らかな毒性なく、全身骨格筋におけるジストロフィンの発現が回復し、筋機能が改善することを示した⁸⁾。本研究成果をふまえて、エクソン7欠失変異をもつ日本人のDMD患者の皮膚から採取した線維芽細胞を筋芽細胞に変換したうえで、筋ジストロフィー犬で用いたモルフォリノをカクテル投与したところ、エクソン6/8スキップを誘導できた⁹⁾。複数のエクソンを同時にスキップすることが可能になったことから、エクソン・スキップ療法の対象となるDMD患者の数が欠失変異をもつDMD患者の約80%に拡大したことが特筆される。しかしながら、筋ジストロフィー犬と同様のエクソン7欠失変異をもつDMD患者の数は少ないと考えられた。

そこで、エクソン・スキップ療法の臨床応用を実現するため、より頻度の高い欠失変異に着目した。ジストロフィン遺伝子の欠失変異の約60%が集積するエクソン45-55のホット・スポット領域を検討した結果、エクソン51をスキップの標的とした場合、対象となる患者の数は欠失変異をもつDMD患者の約13%と最も多いことが判明した⁴⁾。しかしながら、臨床データベース<<http://www.dmd.nl/>>の解析では、エクソン50および51領域を含む欠失変異はインフレームであるにもかかわらず、その表現型はDMDを呈することがあり、またエクソン51スキップにより誘導される短縮型ジストロフィンは蛋白質構造の維持に

重要とされるヒンジ3を欠くことから、エクソン51スキップにより筋機能が改善するかどうか疑問視されていた⁴⁾。われわれの研究グループは、ジストロフィン遺伝子のエクソン52欠失を有する*mdx52*マウスを対象に、筋注により配列を最適化したスプライスアクセプタおよびドナ部位を標的とした2種類のモルフォリノの組み合わせを、経尾静脈的に反復投与(320 mg/kg/週)した(図2a)。その結果、全身の骨格筋でヒンジ3構造を欠いた短縮型ジストロフィンの発現が野生型マウスの20%程度まで回復し、筋機能は改善した(図2b)¹⁾。本研究は、エクソン51スキップ療法を行うことの意義を前臨床的研究として初めて示した点で重要である。

E | DMDに対するエクソン・スキップ療法の開発動向

次のステップは、対象となるDMD患者数の最も多いエクソン51スキップの臨床応用である。これまでに、ヒト由来細胞やマウスを用いて最適化されたアンチセンス人工核酸を用いて、DMDを対象に2'O-メチルおよびモルフォリノを、それぞれ前脛骨筋と長趾伸筋に筋肉内投与した結果、十分なジストロフィンの発現が観察された^{10,11)}。これによりDMD患者を対象にエクソン・スキップを行うことの原理証明がなされたことから、Prosensa/GSK社は、12人のDMDを対象に20 merの2'O-メチル(GSK968)を、6 mg/kgの用量で1週間ごとに、計36回経皮下全身投与後(第I/IIa相試験12回+継続試験24回)、骨格筋における短縮型ジストロフィンの発現が回復し、6分間歩行で評価した運動機能は改善することを報告した²⁾。最近Prosensa/GSK社は、無作為化二重盲検プラセボ対照試験(第III相)を開始した。本治験は、日本、フランス、ドイツなどが参加する国際共同治験であり、DMD患者180人を対象に、GSK968を6 mg/kgの用量で1週間ごとに計48回経皮下全身投与する予定である。一方、AVI社は19人のDMDを対象に、30 merのモルフォリノ(エテプリルセン)を、0.5~20 mg/kgの用量で1週間ごとに計12回経静脈全身投与後、骨格筋における短縮型ジストロフィンの発現回復を認めたが、6分間歩行の改善は認めなかった(<<http://www.avibio.com/>>)。現在、DMDの筋

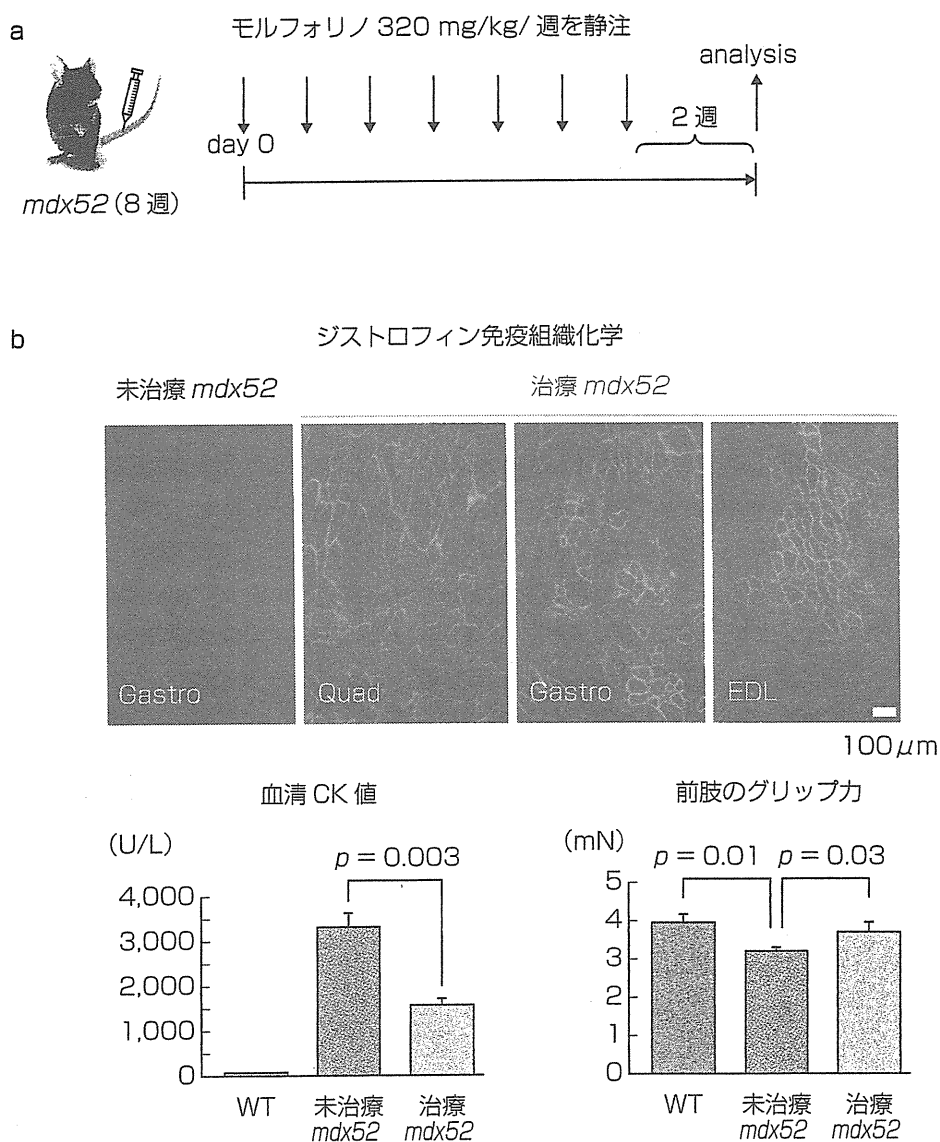


図2 ◆ エクソン51スキップにより *mdx52* マウスの筋機能は改善する

a : *mdx52* マウスを対象にしたモルフォリノの経尾静脈全身反復投与.

b : エクソン51スキップにより大腿四頭筋 (Quad), 腓腹筋 (Gastro), 長趾伸筋 (EDL) を含め, 全身の骨格筋でジストロフィンの発現が回復 (上段). 治療後 *mdx52* マウスの筋機能は未治療 *mdx52* マウスと比べて有意に改善.

機能の改善を目標に, モルフォリノを 30~50 mg/kg の用量で反復全身投与する計画があり, 日本も参加を検討中である.

エクソン51スキップの開発が進むにしたがい, エクソン51以外の複数のエクソンを標的としたエクソン・スキップ療法の開発も併行して進められている (表1). Prosenza/GSK社は, 20メチル (PRO044) を用いたエクソン44スキップの第I/II相試験を実施中である.

表1 ◆ エクソン・スキップ療法の開発動向

標的エクソン	開発段階
51	第II/III相
44	第I/II相
45	前臨床
52	
53	
55	

F | その他の遺伝性筋・神経疾患に対するアンチセンス療法の応用

アンチセンス療法の他の遺伝性筋・神経疾患への応用はすでに始まっている。代表的な疾患として、Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) 遺伝子変異に伴う“gain of toxic function”が原因の家族性筋萎縮性側索硬化症を対象にした*SOD1* 遺伝子のノックダウン療法の治験が進行中である(第I相) (<http://www.isispharm.com/Pipeline/index.htm>)⁴⁾。また、筋強直性ジストロフィー(myotonic dystrophy type 1: DM1) のCUGリピートを対象にしたスプライソソーム関連蛋白質のprotein displacement療法や、脊髄性筋萎縮症を対象にした*SMN2* 遺伝子のエクソン7のexon inclusion療法の開発が進んでいる⁴⁾。

G | エクソン・スキップ療法の今後の課題

これまでの研究成果から、2' O-メチルやモルフォリノ人工核酸を用いたエクソン・スキップ療法の臨床応用をさらに進めるために解決しなければならない課題も明らかとなった¹²⁾。第1に、効果は最大限でも約2~3ヵ月程度と短いため、治療の際にはアンチセンス人工核酸の反復投与が必要である。第2に、アンチセンス人工核酸の正常筋線維への取り込み効率は低い。第3に、骨格筋と比べて心筋でのジストロフィンの発現回復レベルが低いことである。以上の課題を解決するため、近年、核酸の細胞内への取り込みを増加させる目的で、モルフォリノに細胞膜透過性ペプチドであるアルギニン、6-アミノヘキサ酸および/またはβ-アラニンを付加したペプチド結合型モルフォリノが開発されたが、オフターゲットエフェクトが懸念されており、最適な治療用量の設定が未解決である。第4に、1つのエクソンを標的としたエクソン・スキップは、治療対象となる患者の数に限界があり、しかもそれぞれの遺伝子変異に応じたアンチセンス人工核酸が必要となる(テーラーメイド治療)。そのため複数のアンチセンス人工核酸を混合して広範囲のエクソンをスキップさせるマルチ・エクソン・スキップ療法が期待されている。特に、エクソン45-55の範囲内に大小の欠失変異をもつDMD患者に対して、エ

クソン45-55をまとめてスキップすることができれば、欠失変異を有するDMDの63%が治療対象となり得る^{6,13)}。われわれはすでに、エクソン45~55の各エクソンを標的に設計した10種類のモルフォリノを*mdx52*マウスに全身投与することにより、全身の骨格筋でエクソン45~55スキップを誘導させ、筋病理と筋力を改善できることを実証している(Aoki et al., submitted)。

おわりに

ジストロフィン欠損によるDMDに関しては呼吸不全、心不全対策の発展に伴い寿命が延長しているものの、疾患の本態に根ざした治療はいまだ確立されておらず、新規治療法の開発と並んで治験実施基盤の整備が喫緊の課題であった。近年、エクソン・スキップ療法をはじめとする治療研究が目覚ましく進歩したことを受けて、日本では、DMDなどの患者登録サイトであるREMUDY (<http://www.remudy.jp/>) が整備され、筋・神経疾患の新しい治療法の開発を目的とした国際的なネットワークであるTREAT-NMD (<http://www.treat-nmd.eu/home.php>) と連携した活動を行っている。そして、2011年には、希少疾患としては日本で初めて、DMD患者を対象にした国際共同治験が開始されるに至った。DMDを対象に開発されたアンチセンス化合物を用いた新規治療法と治験実施基盤は、その他の遺伝性筋・神経疾患への応用が大いに期待されている。

文献

- 1) Aoki Y et al : In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient *mdx* mouse. *Mol Ther* 18 : 1995-2005, 2010
- 2) Goemans NM et al : Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 364 : 1513-1522, 2011
- 3) Hoffman EP et al : Dystrophin : the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51 : 919-928, 1987
- 4) 青木吉嗣, 武田伸一 : デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソンスキップ療法. 生体の科学, 医学書院, 東京, 128-133, 2011
- 5) Monaco AP et al : An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2 : 90-95, 1988
- 6) Aartsma-Rus A et al : Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* 30 : 293-299,

- 2009
- 7) Tuffery-Giraud S et al : Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database : a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat* **30** : 934-945, 2009
 - 8) Yokota T et al : Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol* **65** : 667-676, 2009
 - 9) Saito T et al : Antisense PMO found in dystrophic dog model was effective in cells from exon 7-deleted DMD patient. *PLoS One* **5** : e12239, 2010
 - 10) van Deutekom JC et al : Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* **357** : 2677-2686, 2007
 - 11) Kinali M et al : Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy : a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol* **8** : 918-928, 2009
 - 12) Aoki Y et al : Antisense oligonucleotide-mediated exon 51-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *International Journal of Advanced Computer Science*, 2011 [in press]
 - 13) Nakamura A et al : Follow-up of three patients with a large in-frame deletion of exons 45-55 in the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *J Clin Neurosci* **15** : 757-763, 2008

Antisense Oligo-Mediated Multiple Exon Skipping in a Dog Model of Duchenne Muscular Dystrophy

Toshifumi Yokota, Eric Hoffman, and Shin'ichi Takeda

Abstract

Exon skipping is currently one of the most promising molecular therapies for Duchenne muscular dystrophy (DMD). We have recently developed multiple exon skipping targeting exons 6 and 8 in dystrophin mRNA of canine X-linked muscular dystrophy (CXMD), an animal model of DMD, which exhibits severe dystrophic phenotype in skeletal muscles and cardiac muscle. We have induced efficient exon skipping both in vitro and in vivo by using cocktail antisense 2'-O-methyl oligonucleotides (2'OMePS) and cocktail phosphorodiamidate morpholino oligomers (morpholinos, or PMOs) and ameliorated phenotype of dystrophic dogs by systemic injections. The multiple exon skipping (double exon skipping) shown here provides the prospect of choosing deletions that optimize the functionality of the truncated dystrophin protein for DMD patients by using a common cocktail that could be validated as a single drug and also potentially applicable for more than 90% of DMD patients.

Key words: Multiple exon skipping, Morpholinos (phosphorodiamidate morpholino oligomers), 2'-O-methylated antisense oligomers (phosphorothioate), Dystrophic dogs (canine X-linked muscular dystrophy), Duchenne/Becker muscular dystrophies

1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD), a progressive and fatal X-linked myopathy, and its milder form, Becker muscular dystrophy (BMD), are caused by mutations in the *DMD* gene (1). Exon skipping using antisense oligonucleotides (AOs) is currently one of the most promising molecular therapies for DMD (2–4). Synthetic derivatives of nucleic acids have been designed and synthesized, where the backbone of RNA and DNA is replaced with other chemistries. One uses a morpholino backbone phosphorodiamidate morpholino oligomers (morpholinos, or PMOs) developed by AVI BioPharma, Portland, Oregon.

Recently, we have successfully induced dystrophin expression by using morpholino-mediated systemic multiple exon skipping and ameliorated dystrophic pathology in dogs (5). Another antisense chemistry 2'-O-methylated phosphorothioate (2'OMePS) has been also shown to effectively induce dystrophin expression systemically in mice in vivo (6).

The canine X-linked muscular dystrophy (CXMD) model contains a point mutation within the acceptor splice site of exon 7. This leads to exclusion of exon 7 from the mRNA transcript (7, 8). To restore the open reading frame, at least two further exons (exons 6 and 8) must be skipped (multiple exon skipping, or multiexon-skipping). Therefore, it is more challenging to rescue dystrophic dogs with exon-skipping strategy. Here, we summarize the method and protocol of antisense-mediated exon skipping in vitro and in vivo in dystrophic CXMD dogs.

2. Materials

2.1. Design of Antisense Oligos

1. Web sites for exonic splicing enhancer ESE targeting. ESE finder [<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>] and Rescue ESE [<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>].

2.2. Transfection of Antisense 2'OMePS into Dog Myoblasts

1. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Bethesda, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Ogden, UT, USA).
2. 0.25% Trypsin and 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (Gibco).
3. Teflon cell scrapers (Fisher, Waltham, MA, USA).
4. Ham's F-10 nutrient mixture with HEPES (Gibco) (9).
5. Fetal calf serum (FCS) (Gibco).
6. Human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) (Sigma-Aldrich, Natick, MA, USA).
7. Penicillin (200 U/mL) and streptomycin (200 µg/mL) (Sigma-Aldrich).
8. AOs (2'OMePS) (Eurogentec, Liège, Belgium) against exons 6 and 8 of the canine dystrophin gene. Ex6A (GUU GAUUGUCGGACCCAGCUCAGG), Ex6B (ACCUAUGA CUGUGGAUGAGAGCGUU), and Ex8A (CUUCCUGG AUGGCUUCA AUGCUCAC).
9. Lipofectin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
10. 2% Horse serum (Gibco).
11. Six-well plates (IWAKI, Funabashi, Japan).

12. Opti-MEM (Gibco).
13. Culture dish (10, 15 cm noncoat and 10, 15 cm collagen coat) (IWAKI).
14. Phosphate buffer saline (PBS).
15. Human recombinant insulin (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich).
16. Proliferation medium: Nutrient Mixture F-10 Ham (Ham's F-10; developed by Ham et al. for mammalian cell proliferation (9)) supplemented with 200 U/mL penicillin, 200 µg/mL streptomycin, 2.5 ng/mL bFGF, and 20% FBS.
17. Differentiation medium: DMEM supplemented with 200 U/mL penicillin, 200 µg/mL streptomycin, and 10 µg/mL insulin.

2.3. Intramuscular Injections of Antisense Oligos in Dogs

1. CXMD dogs and wild type littermates.
2. Antisense morpholinos (Gene-tools, Philomath, OR, USA) against exons 6 and 8 of the dog dystrophin gene. Ex6A (GTTGATTGTCGGACCCAGCTCAGG), Ex6B (ACCTAT GACTGTGGATGAGAGCGTT), and Ex8A (CTTCCTGG ATGGCTTCAATGCTCAC) (see Note 1).
3. Saline (Ohtsuka-Pharmaceutical, Tokyo, Japan).
4. 27G Needles (TERUMO, Tokyo, Japan).
5. Thiopental sodium (Mitsubishi Tanabe Pharma, Osaka, Japan).
6. Isoflurane (Abbott laboratories, Chicago, IL, USA).
7. Butorphanol tartrate (Bedford Laboratories, Bedford, OH, USA).
8. Gauze (Johnson and Johnson, New Brunswick, NJ, USA).
9. Pledget (Johnson and Johnson).
10. Veterinary surgical instruments: forceps, scalpels, scissors, suture needles, threads, and needle holders (Mizuho, Narashino, Japan).
11. Povidone iodine (Meiji Seika, Tokyo, Japan).
12. Heparin sodium (Fuji Pharmaceutical, Tokyo, Japan).
13. Surgical glove (Ansell, Red bank, NJ, USA).
14. Surgical drape (Nagai Leben, Tokyo, Japan).
15. Sepham antibiotics (Cefamezine or Syncl) (Astellas, Tokyo, Japan, or Asahi-kasei, Tokyo, Japan).

2.4. Systemic Injections of Antisense Morpholinos

1. CXMD dogs and wild-type littermates.
2. Syringe infusion pump (Muromachi, Tokyo, Japan).
3. 22G Indwelling needles (TERUMO).
4. 50 mL syringe (TERUMO).

5. Antisense morpholinos (Gene-tools) against exons 6 and 8 of the dog dystrophin gene. Ex6A (GTTGATTGTCGGA CCCAGCTCAGG), Ex6B (ACCTATGACTGTGGATGA GAGCGTT), and Ex8A (CTTCCTGGATGGCTTCAATG CTCAC).

2.5. RNA Extraction

1. Eppendorf tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany).
2. Trizol (Invitrogen).
3. Chloroform (Sigma-Aldrich).
4. Isopropanol (Sigma-Aldrich).
5. 75% Ethanol (Sigma-Aldrich).

2.6. RT-PCR

1. One-Step RT-PCR kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands).
2. Forward primer in exon 5: CTGACTCTTGGTTTGA TTTGGA (Invitrogen).
3. Reverse primer in exon 10: TGCTTCGGTCTCTGTCAATG (Invitrogen).
4. RNAsin (Promega, Madison, WI, USA).

2.7. cDNA Sequencing

1. Gel extraction kit (Qiagen).
2. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
3. ExoSap-IT® (USB, Santa Clara, CA, USA).
4. MicroAmp® Reaction Plates (Applied Biosystems).
5. Qiagen gel extraction kit (Qiagen).
6. Hidi-formamide (Applied Biosystems).
7. ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.8. Muscle Sampling from Necropsy of Dogs

1. Tragacanth gum (Sigma-Aldrich).
2. Isopentane (Sigma-Aldrich).
3. Liquid nitrogen.
4. Cork disks (Iwai-kagaku, Tokyo, Japan).
5. Dry ice.

2.9. Immunostaining for Dog Muscles

1. Poly-l-lysine-coated slides (Fisher, Hampton, NH, USA).
2. Cover glasses (Fisher).
3. Cryostat Microsystem cm1900 (Leica, Wetzlar, Germany).
4. Dystrophin antibodies including DYS1 and DYS2 (Novocastra, Newcastle, UK).
5. Alexa 594 goat antimouse IgG₁, Alexa 594 goat antimouse IgG₂, highly cross-absorbed (Invitrogen).
6. DAPI containing mounting agent (Invitrogen).
7. Goat serum (Invitrogen).

8. Moisture chamber (Scientific Devise Laboratory, Des Plaines, IL, USA).
9. Chamber slide (Lab-tek, Naperville, IL).
10. 4% Paraformaldehyde (PFA).

2.10. Western Blotting from Dog Muscles

1. Lysis buffer: 75 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% SDS, 10 mM EDTA, and 5% 2-mercaptoethanol.
2. Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
3. Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich).
4. 2× Laemmli SDS-loading buffer: 0.1 M Tris-HCl (pH 6.6), 2% (w/v) SDS, 2% (0.28 M) beta-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue.
5. Ready-made 5% resolving SDS gels (Bio-Rad).
6. PVDF membrane (GE, Fairfield, CT, USA).
7. Transfer buffer (10×): 250 mM of Tris-Base, 1,920 mM of Glycine.
8. Transfer buffer (1×): 10% 10× buffer, 20% methanol.
9. Dystrophin antibodies including DYS1 and DYS2 (Novocastra) and desmin antibody (Abcam, Cambridge, MA, USA).
10. ECL plus kit (GE).
11. ECL and autoradiography film (GE).
12. ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.11. Clinical Grading of Dogs

1. Video camera.
2. Stop watch.

3. Methods

3.1. Design of Antisense Oligos

1. Identify ESE sites in exons using Rescue ESE and ESEfinder.
2. Design antisense sequences to target ESEs of exon 6 (Ex6A) and exon 8 (Ex8A), or exon/intron boundary between exon 6 and intron 6 (Ex6B), or between exon 8 and intron 8 (Ex8B) (see Note 2).
3. Select antisense oligonucleotide chemistries. 2'OMePS is preferred for myoblast experiment (see Note 3). PMOs are used for in vivo studies (see Note 1).

3.2. Transfection of Antisense 2'OMePS into Dog Myoblasts

1. Use standard preplating method to obtain primary myoblast cells from neonatal CXMD dogs (10).
2. Culture WT or CXMD myoblasts (1.5×10^5 cells) in growth medium containing F-10, FCS (20%), bFGF (2.5 ng/mL),

penicillin (200 U/mL), and streptomycin (200 µg/mL) for 72 h, on six-well plates.

3. Dilute lipofectin to a total of 100 µL in opti-MEM media at a ratio of 2:1 for lipofectin: RNA (Use 10 µL lipofectin for 5 mg RNA).
4. Allow to stand still at RT for 30–45 min, then dilute AOs to a final volume of 100 µL in opti-MEM media.
5. Combine diluted lipofectin and AOs and mix gently.
6. Incubate at RT for 10–15 min.
7. Remove serum-containing medium from cells and wash them with opti-MEM reduced serum media.
8. Add 0.8 µL opti-MEM media to the tube containing the lipofectin DNA complexes.
9. Mix gently and overlay the complex onto the cells.
10. Return cells to the incubator and after 3 h replace opti-MEM media with differentiation medium and wait 3–10 days until they differentiate into myotubes.

3.3. Intramuscular Injections of Antisense Oligos in Dogs

1. Induce general anesthesia by 20 mg/kg of thiopental sodium injections and maintain by isoflurane inhalation (2.0–3.0%).
2. Cut skin above tibialis anterior (TA) muscle with scalpel.
3. Stitch the fascia of TA muscles at two different points at 2 cm intervals as markers; i.e., inner side distal/outer side proximal.
4. Bend needles (10°) to inject PMOs horizontally using 27 G needle, inject PMO solutions slowly into muscles and wait 1 min before removing the needle to prevent leakage.
5. Inject butorphanol tartrate (0.2 mg/kg) before and after procedure.
6. Administer sepham antibiotics (Cefamezine or Syncl) for three days after surgical procedures.

3.4. Systemic Injections of Antisense Morpholinos

1. Dissolve 120–200 mg/kg of morpholinos Ex6A, Ex6B, and Ex8A at 32 mg/mL in saline.
2. Inject them into saphenous vein of a dog using 22 G indwelling needles for each injection using infusion pumps to inject at 50 mL/20 min.
3. Inject morpholinos for 5–11 times at weekly or biweekly intervals.

3.5. RNA Extraction from Myotubes

1. Remove medium.
2. Put 1 mL Trizol for each well of six-well plates.
3. Wait 10 min.